

補助事業番号 2018M-185
補助事業名 2018年度 安全なiPS細胞樹立用の簡便高効率な沿面放電型プラズマ
遺伝子導入装置の開発 補助事業
補助事業者名 愛媛大学 工学部 電気電子工学科 電気エネルギー変換工学研究室
神野雅文

1 研究の概要

実用的な再生医療ではより安全性が高く、分化能が高い細胞が大量に必要となるため、これらの課題がクリアできる全く新しい遺伝子導入装置が必要となります。これらの課題を解決するために、私たちは沿面放電を用いることで再生医療などの先端医療で用いることが可能な新たな遺伝子導入装置の実用化を目指します。具体的には、沿面放電遺伝子導入装置の電極配置などの装置条件を最適化することで処理面積の大幅な増大を確立するとともに、この大幅な沿面放電遺伝子導入装置でiPS細胞の樹立条件を確立します。樹立したiPS細胞については副作用などを起こす可能性がないことを明らかにするための安全性の評価を行います。さらに、駆動電圧を周波数高周波化することで装置の小型化および低価格化を目指し、最終的に安全性が高くiPS細胞を大量に樹立することが可能なコストパフォーマンスの高い装置の実用化に目処をつけます。

2 研究の目的と背景

これまでiPS細胞の樹立はウイルスにより遺伝子を細胞内に導入していたため、発がんのリスクがありました。この問題に対し従来法の1つである発がん性のない電圧ポレーション法での樹立も試みられていますが、標的細胞へのダメージが大きく、また導入した遺伝子およびベクターの染色体へのランダム (or無差別な) な組み込み (ランダムインテグレーション) による染色体の遺伝情報の欠失 (or欠損?) も実際の医療への展開への大きな障壁となっています。そのため、大量の安全なiPS細胞を実用に足る簡便な手順で樹立できる新たなiPS細胞樹立法が求められています。

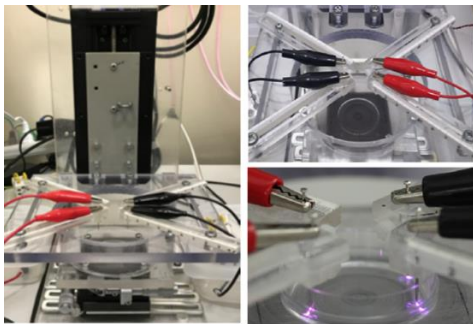
本研究では、沿面放電という簡便な方法で、高効率で安全なiPS細胞を樹立するための装置と技術を開発し、これにより、ウイルスを使わず発がん性の問題を解消して、再生医療の実現に資することを最終的な目的とし、そのために簡便・高効率で安全性が担保できる (発がん性のリスクがない) iPS細胞樹立技術の確立と装置の開発を目指します。またこの装置の汎用性を高めてiPS細胞樹立以外にも使える汎用的な技術・装置としての開発も行います。

3 研究内容

(1) 沿面放電処理条件の最適化とiPS細胞の樹立 (<http://www.mayu.ee.ehime-u.ac.jp/jka.html>)

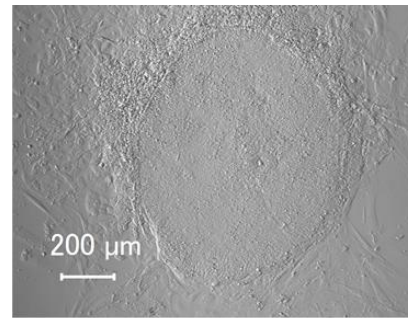
沿面放電遺伝子導入装置の電極配置および印加電圧の大きさと電圧を印加する時間を変化させて諸条件を最適化しました。その結果、iPS細胞の樹立に必要なヒト皮膚線維芽細胞（HDF細胞）への遺伝子導入に最適な条件を得ることが出来ました。

次にiPS化に必要となる山中因子がエンコードされた4種類のプラスミドを同時にHDF細胞に滴下し、沿面放電処理したところ、約3週間以降に3.5cmのシャーレ1枚につき2~5個のiPS細胞様のコロニー（下図）が得られました。この結果は、4種の山中因子遺伝子（複数遺伝子）が同時に細胞に導入され、細胞の初期化（iPS化）が起こったことを示唆しています。更に、細胞に感染することで遺伝子が導入されるウイルスベクター法や電氣的に細胞膜穿孔を起こすことで遺伝子が導入されるエレクトロポレーション法と異なり、沿面放電遺伝子導入法ではほとんどランダムインテグレーションが起こらないことから、遺伝子導入時に染色体遺伝子を傷つけない可能性が高く、安全性の高いiPS細胞が得られる可能性が高いことが明らかになりました。



沿面放電遺伝子導入装置

左：全景、 右上：電極部 右下：放電の様子



沿面放電法により樹立した

iPSコロニー

4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

本研究により開発された沿面放電型プラズマ遺伝子導入技術を用いることで、大量の細胞に簡便に遺伝子を導入することができます。従って、この装置と技術により、安全なiPS細胞を大量に作成して医療機関や研究機関に提供することで再生医療分野へ貢献すること期待出来ます。また特定の疾病を発症させる細胞を大量に作製し、マウス等に移植することで、病態モデル生物を作成することも可能であり、医薬品の研究開発などでの利用が見込まれます。

5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

本研究は、工学と分子生物学とが融合した新しい学問および研究領域であり、その新領域を開拓するに至った非常に重要な研究です。

6 本研究にかかわる知財・発表論文等

発表論文等

- [1] Tatsuya Hiramatsu, Hiroko Hirashige, Yugo Kido, Susumu Satoh, and Masafumi Jinno, “Importance of collision frequency in the molecular size dependency of genetransfer efficiency in the surface discharge method” , *Japanese Journal of Applied Physics*, **58**, SEEG05 (2019)
- [2] M. Jinno, T. Hiramatsu, H. Hirashige, Y. Kido, and S. Satoh, “Gene transfer efficiency of surface discharge method depending on molecular size and collision frequency between gene and cell” , *24th International Symposium on Plasma Chemistry*, (2019)
- [3] T. Hiramatsu, H. Hirashige, Y. Kido, S. Satoh, and M. Jinno, “Molecular size dependence of gene transfer efficiency into human cells using surface discharge” , *40th International symposium on dry process*, P-83, (2018)

知財

「TRANSFORMED CELL PRODUCTION METHOD(形質転換細胞の製造方法)」 W02019244895

7 補助事業に係る成果物

(1) 補助事業により作成したもの

特になし

(2) (1) 以外で当事業において作成したもの

特になし

8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名： 愛媛大学大学院（エヒメダイガクダイガクイン）

住 所： 〒790-8577

愛媛県松山市文京町3

担 当 者： 教授 神野 雅文（ジンノ マサフミ）

担 当 部 署： 理工学研究科（リコウガクケンキュウカ）

E - m a i l : mjin@mayu.ee.ehime-u.ac.jp

U R L : <http://www.mayu.ee.ehime-u.ac.jp/>